

**" Oligonucléotide et son utilisation pour moduler l'expression de la Protein-Kinase C isoforme béta-1 comme agent de dépigmentation cutanée "**

La présente invention concerne des séquences oligonucléotidiques ainsi que leurs dérivés capables de s'hybrider avec le gène ou avec les produits du gène codant pour la Protein-Kinase C (PKC) isoforme beta-1(PKC-beta-1).

La présente invention concerne également l'utilisation de ces nouvelles séquences oligonucléotidiques comme agent dépigmentant ou blanchissant de la peau dans une composition cosmétique ou dans une composition dermatologique.

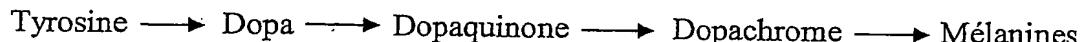
Chez l'homme, la pigmentation résulte de la synthèse et de la distribution des pigments mélaniques dans la peau, les follicules pileux ou les yeux. La pigmentation est génétiquement prédefinie mais elle est régulée par de nombreux facteurs internes ou externes. Les mélanines produites par les mélanocytes ainsi que le nombre de mélanocytes, leur activité tyrosinasique et leur capacité à exporter les mélanines vers les kératinocytes, la taille des mélosomes qui contiennent des grains de mélanine, vont conditionner la couleur de la peau humaine. Pour chaque individu, la couleur de la peau varie principalement en fonction de l'irradiation plus ou moins importante des rayons ultra-violets (UV). Autrement dit pour chaque individu, il existe une pigmentation cutanée de base lorsqu'il subit la plus faible irradiation UV, correspondant à sa couleur de peau la plus claire, et une pigmentation cutanée plus intense s'il reçoit une irradiation UV plus forte, allant jusqu'à une pigmentation maximum correspondant à sa couleur de peau la plus foncée lorsqu'il est exposé de manière prolongée à une irradiation UV intense, telle que celle que l'on peut rencontrer en altitude en montagne.

D'autre part, comme on le sait bien, il existe dans la population mondiale, une très grande diversité génétique quant à la pigmentation cutanée. Ainsi, selon les populations, la couleur de la peau correspondant à la pigmentation de base définie ci-dessus, présente une teinte plus ou moins claire se situant entre les deux extrêmes : très claire et très foncée. Egalement selon les populations, la différence de teinte de la peau entre la pigmentation de base et la pigmentation maximum est plus ou moins importante. Ainsi, il est bien connu que les personnes appartenant à certaines populations à peau claire (pigmentation de base) réagissent rapidement et/ou de manière importante à l'action des UV et peuvent donc facilement présenter une peau de teinte foncée, même lorsque ces personnes ne se sont pas

exposées volontairement et de façon prolongée au soleil. Dans la suite du texte, ces personnes seront désignées par l'expression « personnes très réactives aux UV ». Il en est notamment ainsi de populations d'origine asiatique ou de certaines populations dites métisses.

5 Par ailleurs, des personnes voient apparaître sur leur peau, en particulier au niveau du visage ou des mains des zones et/ou des taches plus foncées et/ou plus colorées conférant à la peau une hétérogénéité. Ces taches sont dues à une concentration importante de mélanine dans les kératinocytes de l'épiderme.

Le mécanisme de formation de la pigmentation cutanée fait intervenir la 10 synthèse des mélanines. Ce mécanisme est particulièrement complexe et fait intervenir schématiquement les principales étapes suivantes :



La tyrosinase, activée par une réaction de phosphorylation catalysée par la Protein Kinase C, est une enzyme essentielle intervenant dans cette suite de 15 réactions. La tyrosinase catalyse notamment la réaction de transformation de la tyrosine en Dopa (Dihydroxyphénylalanine) et la réaction de transformation de la Dopa en Dopaquinone conduisant à la formation des pigments mélaniques.

Une molécule est reconnue comme dépigmentante si elle agit directement sur les mélanocytes épidermiques en inhibant l'activité de ces cellules et/ou si elle 20 bloque l'une des étapes de la biosynthèse des mélanines. C'est le cas notamment lorsque la molécule inhibe l'une des enzymes impliquées dans la mélanogénèse ou lorsqu'elle réagit avec les composés chimiques de la chaîne de synthèse des mélanines.

Les substances dépigmentantes connues sont notamment l'hydroquinone et 25 ses dérivés, l'acide ascorbique et ses dérivés, des extraits placentaires, l'acide kojique, l'arbutine, les iminophénols (WO 99/22707), l'association de carnitine et de quinone (DE 19806947), les dérivés amides d'amino-phénol (FR 2 772 607), et les dérivés de benzothiazole (WO 99/24035). Ces substances peuvent présenter certains inconvénients. Elles peuvent être instables, nécessiter une utilisation à des 30 concentrations élevées, manquer de spécificité quant à leur mode d'action, ou présenter un pouvoir cytotoxique ou irritant.

L'utilisation topique de substances dépigmentantes efficaces et inoffensives est particulièrement recherchée en cosmétique et en dermatologie. On utilise notamment ces substances pour traiter des hyperpigmentations régionales par hyper-activité mélanocytaire telles que les mélasmes idiopathiques, les 5 hyperpigmentations localisées par hyper-activité et prolifération mélanocytaire bénigne telles que les taches pigmentaires dites de sénescence (lentigos séniles), les hyperpigmentations accidentelles telles que la photosensibilisation ou la cicatrisation post-lésionnelle, ainsi que certaines leucodermies telles que le vitiligo. Dans ces derniers cas, à défaut de pouvoir repigmenter la peau, on atténue 10 la pigmentation de la périphérie des zones dépigmentées pour donner à la peau une couleur plus homogène.

Des substances dépigmentantes sont également utilisées en tant qu'agents de blanchiment de la peau par certaines personnes, en particulier celles désignées plus haut, qui sont très réactives aux UV, pour éclaircir leur teint, notamment 15 celui de leur visage et de leurs mains, afin de conserver une couleur de peau la plus claire possible ou tout au moins de réduire les effets pigmentants des rayons UV.

Le problème posé aux professionnels est donc la conception, la fabrication ou l'isolement de nouvelles substances dépigmentantes ou de nouveaux agents 20 blanchissant de la peau humaine, des poils et/ou des cheveux ne présentant pas les inconvénients des substances connues, c'est-à-dire qui soient non irritants, non toxiques et/ou non allergisants pour la peau et stables dans une composition, et qu'ils présentent une activité à très faible concentration sans aucune cytotoxicité.

L'utilisation d'un oligonucléotide antisens pour traiter les maladies dues à 25 un dysfonctionnement des mélanocytes, en particulier le vitiligo et d'autres maladies dépigmentantes, a été décrite dans WO 99/25819. Dans ces pathologies cutanées, l'hypopigmentation résulte d'une teneur anormalement élevée en ténascine. Les oligonucléotides décrits dans ce document agissent contre l'hypopigmentation en régulant l'expression de la ténascine.

Au contraire, l'objet de la présente invention consiste à fournir un agent 30 dépigmentant agissant sur le processus de la mélanogénèse, destiné d'une part, dans le cas d'une pigmentation sensiblement homogène, au blanchiment de la

peau, des poils ou des cheveux, c'est-à-dire à diminuer leur pigmentation, et d'autre part, à lutter contre l'hyperpigmentation cutanée à savoir lorsque la peau présente une hétérogénéité de pigmentation.

On connaît de part la demande de brevet WO 01/58918 des oligonucléotides capables de s'hybrider de façon spécifique avec le gène ou un produit du gène codant pour la tyrosinase ou la tyrosinase related-protein 1, enzymes entrant dans le métabolisme de la mélanine. Les séquences décrites permettent de mettre au point des compositions agissant comme agent dépigmentant ou blanchissant de la peau, des poils ou cheveux.

10 Les inventeurs de la présente invention ont trouvé que, de manière surprenante, des séquences d'oligonucléotide, autres que celles pouvant s'hybrider de façon spécifique avec les enzymes spécifiquement impliquées dans le métabolisme de la mélanine, étaient utiles et efficaces pour agir en tant qu'agent dépigmentant ou blanchissant de la peau, des poils ou cheveux, et ce sans procurer 15 d'effet secondaire.

La présente invention a pour objet un oligonucléotide comportant un nombre de nucléotides compris entre 7 et 25, de préférence égal à 20, capable de s'hybrider de façon spécifique avec les gènes ou les produits des gènes codant pour la protéine kinase C beta-1 (PKC beta-1).

20 Les inventeurs de la présente invention ont trouvé que des oligonucléotides pouvant s'hybrider de façon spécifique avec le gène ou les produits des gènes (tels que les ARN) codant pour la PKC isoforme beta-1 présentent une activité dépigmentante. Cette activité existe même à très faible concentration, ce qui augmente l'intérêt de ces oligonucléotides. De plus, ces oligonucléotides selon 25 l'invention ne présentent aucune cytotoxicité.

Les oligonucléotides selon l'invention interviennent en amont des mécanismes de la mélanogénèse en modulant l'expression de la PKC beta-1 et donc son activité. Par conséquent, la diminution de l'activité de la PKC bêta-1 conduit à une diminution de la phosphorylation de la tyrosinase dans les 30 mélanocytes.

Les oligonucléotides selon l'invention offrent une solution idéale aux problèmes posés par les substances utilisées classiquement. Les substances

connues qui inhibent l'activité de la tyrosinase (notamment l'hydroquinone et ses dérivés, l'acide ascorbique et ses dérivés, des extraits placentaires, l'acide kojique, l'arbutine) présentent de multiples effets secondaires inacceptables du fait de leur faible spécificité.

5 La présente invention résout donc les problèmes rencontrés par les recherches antérieures en modulant l'activation de l'enzyme par phosphorylation au lieu d'inhiber directement l'enzyme après son activation pour obtenir l'effet dépigmentant.

10 Dans la présente invention, le terme "oligonucléotide" signifie des polynucléotides formés à partir de nucléobases naturelles et de groupements pentafuranosyles (sucre) formant des nucléosides qui sont reliés entre eux par liaisons phosphodiesters natives. Le terme "oligonucléotides" se réfère donc aux espèces naturelles ou aux espèces synthétiques formés à partir de sous unités naturelles ou de leurs homologues proches.

15 Le terme "oligonucléotides" désigne une structure comprenant des nucléotides, de préférence des désoxyribonucléotides, mais également des ribonucléotides. Le terme concerne seulement la structure primaire de la molécule. Ainsi, ce terme inclut l'ADN double et simple brin, aussi bien que l'ARN double et simple brin.

20 Le terme "oligonucléotides" peut se référer aussi aux parties qui ont des fonctions similaires aux oligonucléotides naturels mais qui peuvent présenter des portions non naturelles. Les oligonucléotides peuvent avoir des parties sucre, des parties nucléobases ou des liaisons internucléotidiques modifiées. Parmi les modifications possibles, les modifications préférées sont les dérivés 2'-O-alkyle sur la partie sucre, en particulier les dérivés 2'-O-éthyloxyméthyle ou 2'-O-méthyle, et/ou les phosphorothioates ou les méthylphosphonates pour le squelette internucléotidique.

30 Les oligonucléotides chimériques sont compris dans les modifications préférentielles de l'invention. Les oligonucléotides contiennent au moins deux régions chimiquement différentes, chacune comprenant au moins un nucléotide. Il s'agit en particulier d'une ou de plusieurs régions comprenant un nucléotide modifié qui confère une ou plusieurs propriétés bénéfiques comme par exemple

une meilleure stabilité biologique, une biodisponibilité accrue, l'augmentation de l'internalisation cellulaire ou l'augmentation de l'affinité pour l'ARN cible.

De façon préférée, le squelette internucléotidique peut être en tout ou partie phosphodiesters, ou phosphorothioates, ou méthylphosphonates ou les 5 combinaisons de liaisons phosphodiesters et/ou phosphorothioates et/ou méthylphosphonates.

Le terme "oligonucléotide" peut également se référer à des oligonucléotides auxquels on a greffé un vecteur d'administration circulaire de type plasmidique ou un vecteur d'administration linéaire de type acide nucléique 10 ou peptidique.

Dans la présente invention, on entend par :

- "capable de s'hybrider" ou "hybridation", la formation de liaisons hydrogènes, aussi connue comme appariement Watson-Crick entre les bases complémentaires, usuellement sur deux brins d'acide nucléique pour former un 15 duplex en double hélice, ou triplex si l'oligonucléotide est constitué d'un double brin.

Le degré de complémentarité entre deux séquences d'acide nucléique de longueur identique est déterminé en comparant, après alignement, la première séquence avec la séquence complémentaire de la seconde séquence. Le degré de 20 complémentarité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide est identique entre les deux séquences ainsi comparées, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le degré de complémentarité entre ces deux séquences.

25 - "gène codant pour la PKC", la séquence génomique de la PKC comprenant les introns et exons de ce gène.

- "PKC beta-1", l'isoforme beta-1 de la PKC

- "produit des gènes codant pour la PKC", les séquences ARN messagers.

30 L'oligonucléotide selon l'invention s'hybride de préférence spécifiquement avec le gène ou les produits du gène codant pour la PKC isoforme beta-1. En particulier, l'oligonucléotide de l'invention est capable de s'hybrider avec l'ADN du gène qui code pour la PKC et/ou avec l'ARNm dérivant de ces gènes. Les

oligonucléotides selon l'invention comportent un nombre de nucléotides suffisant en identité et en nombre pour s'hybrider de façon spécifique. Cette propriété est couramment appelée "antisens".

Dans la présente invention, le terme "hybridation spécifique" signifie en particulier qu'il existe un degré de complémentarité suffisant pour éviter la fixation non spécifique de l'oligonucléotide sur une séquence non ciblée dans les conditions où la fixation spécifique est souhaitée. Il est entendu que l'oligonucléotide n'a pas besoin de présenter une complémentarité de 100% avec la séquence de l'acide nucléique cible pour s'hybrider spécifiquement. En particulier, un oligonucléotide présentant un degré de complémentarité au moins égal à 80 % environ est capable de s'hybrider spécifiquement avec l'acide nucléique choisi comme cible.

Le rôle d'activateur de la tyrosinase par phosphorylation joué par la PKC et le rôle clé de la tyrosinase dans la mélanogénèse sont connus. L'utilisation d'un oligonucléotide dirigé contre un ARN messager codant pour une enzyme ou une protéine et même la PKC bêta-1 afin d'en moduler l'expression est également connue.

Cependant, le rôle de l'isoforme bêta-1 de la Protein Kinase C n'était pas connu spécifiquement dans la mélanogénèse. Le caractère ubiquitaire de la PKC fait que la non spécificité d'action des inhibiteurs classiques est rédhibitoire pour un usage dermatologique ou pharmaceutique. De plus, les inhibiteurs classiques de la PKC bêta couvrent les isoformes bêta-1 et bêta-2 et ne sont donc pas spécifiques des mélanocytes puisque des cellules comme les cellules de Langerhans présentes dans la peau ont une activité PKC bêta-2.

La technique élaborée par les inventeurs de la présente invention est la seule qui permette d'avoir une action spécifique sur l'isoforme bêta-1 en préservant les autres isoformes de la PKC bêta et de la PKC en général. De plus cette technique n'avait jamais été utilisée comme moyen de dépigmentation.

L'oligonucléotide selon l'invention est déterminé pour s'hybrider directement à l'ARN messager ou au gène. Ils permettent ainsi de réaliser une modulation ultime de la quantité de PKC bêta-1 produite par les gènes.

Dans un mode de réalisation préférentiel, l'oligonucléotide selon l'invention est capable de s'hybrider de façon spécifique avec une quelconque des régions 5' à 3', codante ou non codante des gènes codant pour la PKC bêta-1.

Dans un mode de réalisation plus préférentiel, la séquence de 5 l'oligonucléotide est l'une des séquences SEQ ID N°1 à SEQ ID N°5 ayant la signification suivante :

- SEQ ID N°1 : ACACCCCCAGGGCTCAACGATG
- SED ID N°2 : TGG AGT TTG CAT TCA CCT AC
- SEQ ID N°3 : AAA GGC CTC TAA GAC AAG CT
- SED ID N°4 : GCC AGC ATC TGC ACC GTG AA
- SED ID N°5 : CCG AAG CTT ACT CAC AAT TT

Dans un mode de réalisation encore plus préférentiel, la séquence est l'une des séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°4, et plus particulièrement la séquence SEQ ID N°1.

15 Dans un autre mode de réalisation préférentiel selon l'invention, l'oligonucléotide comprend une ou plusieurs modifications chimiques au niveau de ses parties sucres, ses parties nucléobases ou son squelette internucléotidique qui confèrent des caractéristiques physico-chimiques améliorées audit oligonucléotide.

20 Par "caractéristiques physico-chimiques améliorées", on entend des caractéristiques souhaitables de l'oligonucléotide selon l'invention, telles qu'une biodisponibilité accrue, l'augmentation de l'affinité pour les séquences cibles, l'augmentation de l'internalisation cellulaire ou une meilleure stabilité biologique ou l'augmentation de la stabilité en présence de nucléases cellulaires.

25 A titre d'exemple, les modifications pouvant conférer ces caractéristiques sont les dérivés 2'-O-alkyle et 2'-O-fluoro sur la partie sucre du nucléoside, et les dérivés phosphorothioates ou les dérivés méthylphosphonates au niveau du squelette internucléotidique.

Dans un mode de réalisation préférentiel selon l'invention, 30 l'oligonucléotide est modifié chimiquement en ce que :

- une partie des groupements phosphodiesters de son squelette internucléotidique est remplacée par des groupements phosphorothioates.

une partie des groupements phosphodiesters de son squelette internucléotidique est remplacée par des groupements méthylphosphonates.

tous les groupements phosphodiesters sont remplacés par des groupements phosphorothioates.

5 tous les groupements phosphodiesters sont remplacés par des groupements méthylphosphonates.

- les groupements phosphodiesters sont remplacés en tout ou partie par des groupements phosphorothioates et/ou par des groupements méthylphosphonates.

10 - on a greffé sur l'oligonucléotide un vecteur d'administration linéaire de type acide nucléique ou peptidique, ou un vecteur d'administration circulaire de type plasmidique.

La présente invention a aussi pour objet une composition cosmétique contenant l'oligonucléotide décrit précédemment et un milieu cosmétiquement acceptable.

15 Une telle composition peut contenir en outre, un ou plusieurs agents actifs visant à renforcer les effets recherchés.

Lesdits agents actifs utilisables en association avec l'oligonucléotide selon l'invention, utilisés purs ou provenant d'extraits renfermant ces molécules, sont notamment les composés suivants: un oligonucléotide antisens dirigé contre les 20 produits d'expression du gène de la tyrosinase, un oligonucléotide antisens dirigé contre les produits d'expression du gène de la tyrosinase-related-protein 1 (TRP-1), l'acide ellagique et ses dérivés ; l'hydroquinone ; l'arbutine ; le résorcinol et ses dérivés ; la vitamine C et ses dérivés ; le pantothéate sulfonate et ses dérivés ; l'acide kojique ; les extraits placentaires ; des molécules interférant directement 25 ou indirectement avec l'alpha-mélanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) ou son récepteur ou l'hormone adrénocorticotropique (ACTH) ; les polyols tels que la glycérine le glycol ou le propylène glycol ; les vitamines ; les agents kératolytiques et/ou desquamants tels que l'acide salicylique et ses dérivés ; les alpha-hydroxyacides tels que l'acide lactique ou l'acide malique, seuls ou greffés ; 30 l'acide ascorbique et ses dérivés ; les rétinoides et les caroténoides en préparation liposomique ou non tels que le rétinaldéhyde ; le rétinol et ses dérivés tels que le palmitate, le propionate ou l'acétate, le bêta-carotène, des agents antiglycation

et/ou antioxydants pris seuls ou en association tels que le tocophérol et ses dérivés, l'ergothionéine, la thiotaurine, l'hypotaurine, l'aminoguanidine, la thiamine pyrophosphate, la pyridoxamine, la lysine, l'histidine, l'arginine, la phénylalanine, la pyridoxine, l'adénosine triphosphate ; les agents anti-inflammatoires tels que le stéaryl glycyrrhétinate ; les agents apaisants et leurs mélanges, les filtres solaires chimiques ou physiques tels que le méthoxycinnamate d'octyle, le butyl-méthoxydibenzoyl-méthane, l'oxyde de titane et l'oxyde de zinc ; et les acides désoxyribonucléiques et/ou nucléiques.

En cas d'incompatibilité, ces actifs et/ou les oligonucléotides peuvent être incorporés dans des sphérides, notamment des vésicules formées de lipides amphiphiles ioniques ou non ioniques telles que décrites dans le brevet français FR 2534487 et/ou des nanoparticules et/ou des nanosphères.

La composition cosmétique selon l'invention est appropriée pour une utilisation topique et contient donc un milieu cosmétiquement acceptable, c'est-à-dire compatible avec la peau.

La séquence oligonucléotide selon l'invention peut être présente de manière préférentielle en quantité allant de 0,00001% à 10% et de préférence de 0,0003% à 3% du poids total de la composition cosmétique.

La composition de l'invention peut se présenter sous toutes les formes galéniques normalement utilisées pour une application topique notamment sous forme d'une solution aqueuse, hydroalcoolique ou huileuse, d'une émulsion huile dans eau ou eau dans huile ou multiple, d'un gel aqueux ou huileux, d'un produit anhydre liquide, pâteux ou solide, d'une dispersion d'huile dans une phase polymérique telle que les nanosphères et les nanocapsules ou mieux des vésicules lipidiques de type ionique et/ou non-ionique tels que décrit dans le brevet français FR 2534487.

Cette composition peut être plus ou moins fluide et avoir l'aspect d'une crème blanche ou colorée, d'une pommade, d'un lait, d'une lotion, d'un sérum, d'une pâte ou d'une mousse. Elle peut éventuellement être appliquée sur la peau sous forme d'aérosol. Elle peut également se présenter sous forme solide pulvérulent ou non, par exemple sous forme stick. Elle peut encore se présenter sous la forme de patchs, de crayons, de pinceaux et d'applicateurs autorisant une

application localisée sur les taches du visage ou des mains. Elle peut être utilisée comme produit de soin et/ou comme produit de maquillage.

De façon connue, la composition de l'invention peut contenir également les adjuvants habituels dans les domaines cosmétique, tels que les gélifiants hydrophiles ou lipophiles, les actifs hydrophiles ou lipophiles, les conservateurs, les antioxydants, les solvants, les parfums, les charges, les filtres, les pigments, les absorbeurs d'odeur et les matières colorantes. Les quantités de ces différents adjuvants sont celles classiquement utilisées dans les domaines considérés. Ces adjuvants, selon leur nature, peuvent être introduits dans la phase grasse, dans la phase aqueuse, dans les vésicules lipidiques et/ou dans les nanoparticules.

Dans un mode de réalisation préférentiel selon l'invention, la composition cosmétologique se présente sous la forme d'une émulsion contenant une huile, un émulsionnant choisi parmi les esters d'acide gras et de polyéthylène glycol, tels que le stéarate de PEG-20, et les esters d'acide gras et de glycérine, tels que le stéarate de glycérine, et un co-émulsionnant.

Lorsque la composition cosmétique de l'invention est une émulsion, la proportion de la phase grasse peut aller de 5 à 80% en poids, et de préférence de 5 à 50% en poids par rapport au poids total de la composition. Les huiles, les émulsionnats et les co-émulsionnats utilisés dans la composition sous forme d'émulsion sont choisis parmi ceux classiquement utilisés dans le domaine considéré. L'émulsionnant et le co-émulsionnant sont présents, dans la composition, en une proportion allant de 0,3% à 30% en poids, et de préférence de 0,5% à 20% en poids par rapport au poids total de la composition.

Comme huiles utilisables en association avec les oligonucléotides selon l'invention, on peut citer les huiles minérales (huile de vaseline), les huiles d'origine végétale (huile d'avocat, huile de soja), les huiles d'origine animale (lanoline), les huiles de synthèse (perhydrosqualène), les huiles siliconées (cyclométhicone) et les huiles fluorées (perfluoropolyéthers). On peut aussi utiliser comme matière grasses des alcools gras (alcool cétylique), des acides gras, des cires (cire de Carnauba, ozokérite).

Comme émulsionnats et coémulsionnats utilisables en association avec les oligonucléotides selon l'invention, on peut citer par exemple les esters d'acide

gras et de polyéthylène glycol tels que le stéarate de PEG-20 et les esters d'acide gras et de glycérine tels que le stéarate de glycéryle.

Comme gélifiants hydrophiles utilisables en association avec les oligonucléotides selon l'invention, on peut citer en particulier les polymères carboxyvinyliques (carbomer), les copolymères acryliques tels que les copolymères d'acrylates/alkylacrylates, les polyacrylamides, les polysaccharides, les gommes naturelles et les argiles. Comme gélifiants lipophiles, on peut citer les argiles modifiées comme les bentones, les sels métalliques d'acides gras, la silice hydrophobe et les polyéthylènes.

10 La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une séquence oligonucléotide dirigée contre les produits de transcription des gènes codant pour la PKC beta-1 pour la fabrication d'une composition cosmétique.

Cette composition cosmétique est utile pour dépigmenter et/ou blanchir la peau, les poils et/ou les cheveux humains.

15 La présente invention a également pour objet l'utilisation d'au moins un oligonucléotide à titre d'agent actif inhibiteur de la synthèse de la mélanine pour la fabrication d'une composition pharmaceutique topique destinée au traitement ou à la prévention des hyperpigmentations régionales par hyper-activité mélanocytaire telles que les mélasmes idiopathiques, des hyperpigmentations 20 localisées par hyper-activité et prolifération mélanocytaire bénigne telles que les taches pigmentaires séniles (lentigo actiniques), des hyperpigmentations accidentelles telles que la photosensibilisation ou la cicatrisation post-lésionnelle, et pour le traitement de certaines leucodermies telles que le vitiligo.

Dans un mode de réalisation préférentiel selon l'invention, l'utilisation est 25 caractérisée en ce que le/les oligonucléotides selon l'invention représentent 0,00001 % à 10 %, de préférence 0,0003 % à 3 % du poids total de ladite composition pharmaceutique topique

La composition pharmaceutique est destinée à être administrée de façon simultanée, séparée ou étalée dans le temps en association avec un ou plusieurs 30 actifs.

Les exemples suivants illustrent la présente invention sans toutefois la limiter.

Pour des raisons de stabilité dans les milieux de culture in-vitro et conformément à l'usage, les exemples 2 à 4 ont été réalisés avec des dérivés phosphorothioates et les exemples 5 à 12 ont été réalisés indifféremment avec des dérivés phosphorothioates ou phosphodiesters.

Dans les exemples qui suivent, tous les pourcentages sont donnés en poids, sauf indications contraires.

10 **Exemple 1 : Synthèse des Oligonucléotides**

Les oligonucléotides ont été synthétisés avec un synthétiseur automatique (Perseptive Biosystems Expedite modèle 8909) en utilisant la chimie standard des dérivés phosphoramidites en utilisant les protocoles du constructeur. Les  $\beta$ -cyanoéthyldiisopropylphosphoramidites ont été fournis par la société Perseptive Biosystems. Pour les oligonucléotides phosphodiesters, l'étape d'oxydation du phosphite a été effectuée avec une solution d'iode. En ce qui concerne les oligonucléotides phosphorothioates, l'étape d'oxydation du phosphite a été effectuée en utilisant une solution 0,05 M de 3H-1,2-benzodithiol-3-one 1,1-dioxide dans de l'acetonitrile anhydre. Après clivage de la colonne (Controlled Pore Glass, Perseptive Biosystems) et déprotection totale de la séquence par un traitement de 18h à 55°C par une solution d'ammoniaque à 33%, les oligonucléotides ont été purifiées par précipitation dans l'éthanol en présence d'acétate de sodium. Des contrôles par chromatographie liquide haute pression ont été ensuite réalisés par chromatographie échangeuses d'ions avec élution par un gradient de chlorure de sodium et par chromatographie en phase inverse C18 avec élution par un gradient d'acetonitrile en présence d'acétate de triéthylammonium.

A titre d'exemple, les oligonucléotides suivants ont été synthétisés. Ils sont décrits dans le tableau 1. Il s'agit de cinq séquences de ce tableau, numérotées SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5. Leur activité dépigmentante a fait l'objet d'études rapportées dans les exemples suivants, et plus spécifiquement pour la séquence SEQ ID NO.1.

Dans le tableau 1, les numéros mentionnés sous chaque extrémité des séquences indiquent la position de l'oligonucléotide dans les séquences d'origine.

La séquence provient de la séquence dite « HSPB1A » de l'ARN messager codant pour la protéine kinase C type bêta 1 (Genbank accession number 5 X06318).

Par ailleurs, à titre comparatif, et pour confirmer la spécificité des oligonucléotides selon l'invention vis à vis des gènes ou des produits de gènes codant pour la PKC bêta 1, un oligonucléotide basé sur la séquence SEQ ID N°1 de l'invention, a été synthétisé, à savoir, une séquence dite « contrôle sens », 10 désignée SEQ ID N°6 dans le tableau 1, consistant à inverser l'ordre des bases de la séquence SEQ ID N°1.

TABLEAU 1

SEQ ID NO.	SEQUENCE OLIGONUCLEOTIDE	LOCUS
1.	ACA CCC CAG GCT CAACGA TG 2186 2167	HSPKCB1A
2.	TGG AGT TTG CAT TCA CCT AC 2168 2149	HSPKCB1A
3.	AAA GGC CTC TAA GAC AAG CT 2285 2266	HSPKCB1A
4.	GCC AGC ATC TGC ACC GTG AA 2250 2231	HSPKCB1A
5.	CCG AAG CTT ACT CAC AAT TT 2569 2550	HSPKCB1A
6.	GTA GCA ACT CGG ACC CCA CA 2167 2186	HSPKCB1A

15 Exemple 2 : Activité anti-PKC bêta 1 de la séquence SEQ ID N°1 sur mélanocytes par western-blot

Les mélanocytes M4Beu sont des cellules isolées de mélanome humain. (R. Jacobovich et J.F. Dore Cancer Immunol. Immunother., 7 (1979), 59-64.).

Le milieu de culture utilisé pour ces cellules est le milieu Dubelco's Modified Eagle supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Gibco, Paisley, GB) et de gentamicine à une concentration de 4 $\mu$ g/ml.

Les cellules M4Beu sont ensemencées à 500 000 cellules par boîte avec la SEQ ID N°1 ou la SEQ ID n°6 à 1 $\mu$ M dans le milieu et pendant 3 jours le milieu est changé une fois avec la SEQ ID N°1 ou la SEQ ID n°6 jusqu'à confluence des cellules, les cellules étant récupérées 24 heures après le dernier traitement.

Lorsque les cellules sont confluentes, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS. Les cellules sont ensuite collectées par grattage dans 200 $\mu$ l de tampon de lyse complet. La suspension est congelée à -80°C. Le lysat cellulaire est obtenu par sonication à une amplitude de 7 $\mu$ m pendant 2x10s.

Les protéines du lysat cellulaire sont dosées selon la méthode colorimétrique de Bradford en utilisant la micro méthode du kit Biorad (Référence: Bio-Rad protein assay 500-0002, Hercules CA, USA).

L'électrophorèse des protéines est réalisée en minigel de polyacrylamide de 1mm d'épaisseur à 7,5 % en conditions dénaturantes et réductrices, en tampon discontinu selon la méthode de Laemmli (1970). Des gels à 7,5% T, 2,7% C permettent de séparer les protéines d'une masse moléculaire de 30 à 200kDa, ce qui nous permet d'avoir la migration de la PKC $\beta$  au milieu du gel.

15  $\mu$ g de protéine du lysat cellulaire sont déposés, complété avec du tampon de lyse à 15 ou 20 $\mu$ l pour déposer un volume fixe. 4 ou 5  $\mu$ l respectivement de bleu de migration 4x sont ajoutés aux lysats qui sont ensuite chauffés à 95 % pendant 5mn pour dénaturer les protéines.

25 L'électrophorèse est réalisée sous réfrigération et à ampérage constant et voltage non limitant.

Après l'électrophorèse, le gel est lavé dans le tampon de transfert, pour une renaturation des protéines. Une membrane de PVDF (polyvinylidènedifluoride,) de bonne tenue mécanique et de forte capacité de fixation des protéines, est également équilibrée dans ce même tampon de transfert.

30 Le transfert est réalisé par électroélution des protéines hors du gel sur la membrane de PVDF. L'appareil, le Trans-blot SD (semi-dry cell), transfert dans

une configuration horizontale. Afin de neutraliser les sites aspécifiques, la membrane est placée dans du lait en poudre demi-écrémé (Régilait®) dissout dans du tampon TBS-T.

Les membranes sont lavées puis incubées avec l'anticorps primaire, c'est-à-dire anti PKC bêta I ou bêta II, sous agitation pendant une heure à température ambiante.

L'anticorps primaire est un anticorps polyclonal de lapin anti PKC bêta I ou bêta II humaine. Il est utilisé à 0,02µg/ml (Santacruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Afin d'éliminer l'excès d'anticorps primaire les membranes sont rincées avec le TBS-T, puis incubées pendant une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire. L'anticorps secondaire est un anti-lapin fait chez le singe couplé à la peroxydase de raifort (Amersham, Buckinghamshire, GB). L'excès d'anticorps est éliminé par rinçages successifs dans le TBS-T.

La détection des protéines se fait par chimioluminescence, utilisant le luminol comme substrat de la peroxydase (kit ECL, Amersham, Buckinghamshire, GB). Après incubation de la membrane avec le luminol et un amplificateur, la membrane est recouverte d'un film autoradiographique (Hyperfilm ECL, Amersham, Buckinghamshire, GB). Le temps d'exposition du film sur la membrane est de 30 minutes. Les taches obtenues sont quantifiées grâce au logiciel "Biolise 3,02V" (BMG LABTECH GmbH, Hanns-Martin-Schleyer-Str. 10, D-77656 Offenburg/Germany). Ce logiciel permet de calculer le volume des taches.

A partir de ces volumes, un pourcentage d'inhibition peut être calculé par rapport à un témoin d'expérience de la manière suivante: [1 - (Vol.de l'échantillon/Vol du témoin)] x100. Les résultats sont présentés dans le Tableau 2 ci-après.

TABLEAU 2

	Pourcentage d'inhibition de la PKC- bêta 1
témoin	0
SEQ ID N°6	5
SEQ ID N°1	100

**Exemple 3 : Activité anti-PKC beta-1 de la séquence SEQ ID N°1 sur mélanocytes par RT-PCR.**

Les mélanocytes M4Beu sont des cellules isolées de mélanome humain. (R 5 Jacobovich et J.F. Dore Cancer Immunol. Immunother., 7 (1979), 59-64.).

Le milieu de culture utilisé pour ces cellules est le milieu Dubelco's Modified Eagle supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Gibco, Paisley, GB) et de gentamicine à une concentration de 4 $\mu$ g/ml.

Les cellules M4Beu sont ensemencées à 500 000 cellules par boîte avec la 10 SEQ ID N°1 ou la SEQ ID n°6 à 1 $\mu$ M dans le milieu et pendant 3 jours le milieu est changé une fois avec la SEQ ID N°1 ou la SEQ ID n°6 jusqu'à confluence des cellules, les cellules étant récupérées 24 heures après le dernier traitement.

Ensuite, le milieu de culture est éliminé. Le tapis cellulaire est rincé avec du PBS. Les cellules sont incubées 1mn avec une solution de trypsine-EDTA la 15 réaction est stoppée par addition de milieu supplémenté avec du SVF à 10%. La suspension cellulaire obtenue est transférée dans un tube de 15ml et centrifugée pour obtenir le culot cellulaire. Ce culot est ensuite rincé deux fois avec du PBS. Il peut être congelé à sec à -80°C.

C'est à partir de ces culots que l'ARN total sera isolé. Après avoir vérifier 20 que le  $\beta$ -mercaptoéthanol a été ajouté au tampon de lyse SV ARN, 175 $\mu$ l de ce tampon est ajouté au culot cellulaire. La dilution des extraits cellulaires dans une solution de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) contenant une grande concentration en guanidine thiocyanate (tampon de lyse SV ARN) permet de détruire les complexes nucléoprotéiques associés aux ARN et donne ainsi une précipitation 25 selective des protéines cellulaires, alors que l'ARN reste en solution. Après centrifugation pour nettoyer le lysat des protéines précipitées et des débris cellulaires, l'ARN va être purifié à partir de ce culot. La solution claire du lysat est ainsi récupérée dans un tube propre.

L'ARN est sélectivement précipité par une solution d'éthanol. Cette 30 précipitation est transférée sur la colonne où l'ARN va se lier aux fibres de verre. Après lavage de la colonne avec la solution de lavage SV ARN, les ARN restent fixés sur la colonne.

La Rnase-free Dnase I est appliquée directement sur la colonne pour digérer les ADN génomiques contaminants. La DNase est agitée pendant 15mn, la réaction est stoppée par addition de 200µl de solution Stop SV Dnase sur la colonne.

5 Puis après lavage avec la solution de lavage SV ARN, les ARN totaux sont finalement élusés de la colonne par addition de 100µl d'eau nuclease-free.

Les ARN sont dosés à 260nm. Une unité de densité optique correspond à 40µg /ml d'ARN. Le rapport de l'absorbance à 260nm et à 280nm (DO 260/DO 280) fournit des indications quant à la pureté de l'ARN préparé et doit se situer 10 entre 1,8 et 2 la présence de protéines pouvant diminuer ce rapport.

La concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) = DO à 260 nm x 40 x facteur de dilution de lecture

La non dégradation de ARNs est vérifiée par électrophorèse d'un aliquot de 2µg en minigel d'agarose à 0,8%. Les ARN sont visualisés grâce au BET.

15 Le gel est préparé en dissolvant 0,4g d'agarose dans 50ml de tampon tris borate, TBE 1x, par chauffage. Au moment de couler le gel 2,5µl de BET à 10mg/ml sont ajoutés.

La migration s'effectue à 80V pendant 30mn.

20 Les ARN 18s, 28s et 4s sont colorés au BET et visualisés sous UV (Table Bioblock Scientific, Illkirch, France, longueur d'onde 312nm).

Des échantillons non dégradés laissent apparaître 2 bandes intenses d'ARN 28s et 18s, ainsi qu'une bande moins intense d'ARN 4S.

25 Pour chaque ARN extrait, deux tubes sont préparés: 1 tube où l'enzyme (Transcription inverse (RT) M-MLV, Gibco, Paisley, GB) sera ajoutée RT+, et 1 où l'enzyme ne sera pas ajoutée RT-. A partir d'un simple brin d'ARN et en présence d'amorces l'enzyme est capable de synthétiser un brin complémentaire.

Les résultats sont présentés dans la Tableau 3.

TABLEAU 3

	RT+	RT-
pdN(6) 6U/ml 0,3U ds l'essai	1µl	1µl
ARN total 2µg/µl ds l'essai	2µg/µl	2µg/µl
H2O	qsp 11,5µl	qsp 11,5µl

Dans le tableau 3, pdN(6) sont des oligonucléotides composés de 6 nucléotides au hasard, ils serviront d'amorce pour la transcriptase inverse.

5 Pour dénaturer les ARN, ces tubes sont mis à 65°C pendant 5mn.

Pendant ce temps, le mélange ou mix ci-dessous présenté dans le Tableau 4 est préparé pour chaque tube RT+ et RT-.

TABLEAU 4

MIX	x1 tube
Tampon RT 5x 1x dans l'essai	4µl
dNTP (10mM) dans l'essai 500µM	1µl
dTT (0,1M) dans l'essai 10mM	2µl
RNA guard	0,5µl
<b>TOTAL</b>	<b>7,5µl</b>

10

Dans chaque tube RT+ et RT-, 7,5µl de mix sont ajoutés.

Puis 1µl d'enzyme RT (200U dans l'essai) est ajoutée dans les tubes RT+, alors que dans les tubes RT-, on ajoute 1µl d'eau. Puis tous les tubes sont incubés pendant 1 heure à 42°C, température optimum pour que l'enzyme soit la plus efficace. Puis la réaction est stoppée en incubant les tubes à 95°C pendant 5mn.

Ainsi dans les tubes RT+ il y a de l'ADN, la RT ayant synthétisé le brin complémentaire de tous les ARN. Par contre dans les RT- il n'y a pas d'ADN, car il n'y a pas eu d'enzyme. Les tubes RT- servent de contrôle dans la réaction de PCR, pour savoir s'il y a contamination par l'ADN génomique.

5 Pour chaque tube RT+ et RT-, on réalise une PCR, c'est à dire une amplification enzymatique d'ADN.

10 2 couples de primer servent d'amorce à l'enzyme (Eurobiotaq® ADN polymerase, Eurobio): couple1 = primer PKC $\beta$ I/Act1, couple 2 = primer PKC $\beta$ /Act2. Dans le même tube, il y aura donc amplification de la PKC $\beta$  ou  $\beta$ I et de l'actine. L'actine servant ici de témoin interne.

Pour chaque ADN provenant de la réaction de transcriptase inverse (RT+) ou non (RT-) les solutions suivantes sont préparées:

ADN de la RT 100ng dans l'essai	MgCl <sub>2</sub> (50mM) 2mM dans l'essai	H <sub>2</sub> O	Total
1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	12 $\mu$ l	15 $\mu$ l

15 Le mélange suivant présenté dans la Tableau 5 est préparé pour tous les tubes.

Le volume final de réaction est de 50 $\mu$ l.

La réaction se fait dans un appareil de PCR (Crocodile II, Appligène, Illkirch, France)

Les conditions de réaction sont pour le couple 1:

20 1 cycle de dénaturation des ADN (ouverture des 2 brins) : 5 minutes à 95°C

40 cycles d'amplification des ADN: 30 secondes à 95°C (ouverture des brins)

30 secondes à 56°C (fixation spécifique des amorces)

25

30 secondes à 72°C (élongation des nouveaux brins)

1 cycle d'élongation des ADN nouvellement formés : 7 minutes à 72°C

TABLEAU 5

Mix PCR	x1 tube
Tampon PCR 10x dans l'essai 1x	5µl
dNTP (10mM) dans l'essai 500mM	1µl
Primer actine sens (5µM) dans l'essai 0,05µM	0,5µl
Primer actine antisens (5µM) dans l'essai 0,05µM	0,5µl
Primer PKCβ ou PKCβI sens (5µM) dans l'essai 1µM	1µl
Primer PKCβ ou PKCβI antisens (5µM) dans l'essai 1µM	1µl
H2O	25,8µl
Taq	0,2µl
Total	35µl

Les conditions de réaction sont pour le couple 2 : Ce sont les mêmes cycles de réaction mais la température de fixation spécifique des amorces est de 50°C.

Quantification de l'expression des ARN PKCβ ou βI par rapport à l'expression de l'actine.

Les fragments d'ADN sont déposés sur un gel d'agarose à 2% coloré au BET. La migration électrophorétique se fait à 80V pendant 45mn. Les bandes correspondant aux ARN sont visualisées sous UV (Table UV 312nm, Bioblock scientific ; Illkirch, France). 2 bandes apparaissent avec les ADN des tubes RT+ et aucune dans les RT-. Une échelle de poids moléculaires est déposée en même temps pour connaître la taille des bandes obtenues.

Pour le couple 1 le fragment correspondant à l'ARN de la PKC $\beta$ I est de 547pb alors que le fragment de l'ARN correspondant à l'actine est de 308pb.

Pour le couple 2: le fragment correspondant à l'ARN de la PKC $\beta$  est de 380pb alors que le fragment de l'ARN correspondant à l'actine est de 514pb.

Les bandes obtenues sont quantifiées grâce au logiciel "Biolise 3,02V". Ce logiciel permet de calculer le volume des bandes.

Nous comparons le rapport du volume des bandes de PKC $\beta$ /actine ou PKC $\beta$ I/actine.

Les résultats sont présentés dans le Tableau 6.

10

**TABLEAU 6**

Pourcentage d'expression de l'ARNm codant pour la PKC- $\beta$ eta 1	
SEQ ID N°6	0
SEQ ID N°1	55

**Exemple 4 : Activité anti-tyrosinase de la SEQ ID N°1 sur mélanocytes.**

Les mélanocytes M4Beu sont des cellules isolées de mélanome humain. (R 15 Jacobovich et J.F. Dore Cancer Immunol. Immunother., 7 (1979), 59-64.).

Le milieu de culture utilisé pour ces cellules est le Dubelco's Modified Eagle Medium supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (Gibco, Paisley, GB) et de gentamicine à une concentration de 4 $\mu$ g/ml.

Les cellules M4Beu sont ensemencées à 100 000 cellules par boîte avec la 20 SEQ ID N°1 ou la SEQ ID n°6 à 1 $\mu$ M dans le milieu et pendant 3 jours le milieu est changé une fois avec la SEQ ID N°1 ou la SEQ ID n°6 jusqu'à confluence des cellules, les cellules étant récupérées 24 heures après le dernier traitement.

Après 3 lavages des boîtes au sérum physiologique ; avec racloire en plastique, les cellules sont récupérées dans 10  $\mu$ l de tampon (0,0625 M Tris HCl 25 pH6, SDS 3%, Glycérol 10%). Une l'électrophorèse (Ready gel Tris-glycine 7,5% (Biorad, Hercules, CA, USA, ref 161-09000) tampon de migration Tris-glycine SDS buffer 1X (Biorad, Hercules, CA, USA, ref : 161-0732 ) est réalisée avec un dépôt du lysat cellulaire à la quantité de 30  $\mu$ g de protéine par puits .

Après migration à 15 mA, le gel est démoulé et rincé 3 fois 20 minutes dans du PBS sous agitation légère pour ramener le pH à 7,5 (pH optimal pour l'activité de la tyrosinase)

La révélation de l'activité tyrosinase est obtenue par incubation du gel 3 heures à 37 °C dans 10 ml d'une solution (1g/l PBS de MBTH Sigma M8006, 1g/l de PBS de DOPA Sigma D9628). le gel est rincé 3 fois au PBS pour arrêter la réaction de la tyrosine sur son substrat. Après photographie, la quantification est ensuite réalisée avec le logiciel "Biolise 3,02V".

Les résultats sont présentés dans la Tableau 7.

10

TABLEAU 7

	Pourcentage d'inhibition de l'activité de la tyrosinase
SEQ ID N°6	0
SEQ ID N°1	55

#### Exemple 5 : Poudre pour l'éclaircissement du teint du visage

Une poudre dont la composition est présentée dans le Tableau 8 a été 15 préparée.

TABLEAU 8

Microcellulose	20,00%
Sodium lauryl sulfoacetate	15,00%
Oligonucléotide SEQ ID NO.1	1,00%
Parfum, colorants, conservateurs	qs.
Talc	Qsp. 100%

Cette poudre présente une double action. Elle permet un nettoyage de la 20 peau, et de plus elle permet, par un usage régulier durant quelques jours, d'éclaircir le teint. On peut l'appliquer sur la peau du visage une à deux fois par jour.

**Exemple 6 : Emulsion-gel visage de jour dépigmentante**

Une émulsion-gel dont la composition est présentée dans le Tableau 8 a été préparée.

5

**TABLEAU 9**

Glycérine	5,00%
triglycérides caprylique/caprique/succinique	5,00%
Méthoxycinnamate d'octyle	1,00%
Diméthicone copolyol	0,50%
Acrylates / C10-30 alkyl acrylate crosspolymer	0,50%
Oligonucléotide SEQ ID NO.4	0,01%
Neutralisant	qs.
Conservateurs, parfum, colorants	qs.
Eau	qsp. 100%

Certaines personnes soumises au rayonnement plus ou moins intense de la lumière du jour, voire du soleil directement, souhaitent conserver un teint clair et éviter l'apparition de taches pigmentées.

10

L'utilisation de l'émulsion-gel ci-dessus permettra d'atteindre ce but. Cette composition s'applique sur le visage généralement le matin. Elle agit aussi bien de manière préventive que curative sur la pigmentation, régulière ou non, du visage.

**Exemple 7 : Fluide protecteur SPF 30 préventif des taches pigmentaires**

15

Un fluide protecteur dont la composition est présentée dans le Tableau 10 a été préparé.

20

Le fluide protecteur est utilisé pour prévenir l'apparition de taches pigmentaires, chez les personnes prédisposées à ce phénomène, avant l'exposition à un rayonnement solaire intense. Il est à noter que la présence d'une concentration élevée en filtre solaire permet de compenser la diminution de la protection naturelle, conséquence de la baisse du taux de mélanine.

TABLEAU 10

Pentacyclométhicone volatile	49,00%
Dioxyde de titane	15,00%
Méthoxycinnamate d'octyle	7,50%
Glycérine	5,00%
Phényltriméthicone	5,00%
Diméthicone copolyol	3,00%
Polyméthylméthacrylate	2,50%
Butyl méthoxydibensoyle méthane	1,00%
Oligonucléotide SEQ ID NO.1	0, 1%
Neutralisant, Parfum, Conservateurs, antioxydants	qs.
Eau	qsp. 100%

Exemple 8 : Crème visage dépigmentante

5

Une crème dont la composition est présentée dans le Tableau 11 a été préparée.

L'utilisation de cette crème permet de traiter les irrégularités de la 10 pigmentation cutanée, en atténuant ou supprimant les taches de sénescence ou les taches pigmentaires actiniques. Elle homogénéise la coloration de la peau et éclaircit le teint.

15

20

TABLEAU 11

Glycéryl stéarate + Peg-100 stéarate	5,00%
Polyisobutène hydrogéné	4,00%
Magnésium ascorbyl phosphate	3,30%
Tricaprylate /caprate de glycérol	3,00%
Squalane	3,00%
Glycérine	2,00%
Cire d'abeille	1,50%
Cétaryl octanoate	1,50%
Alcool cétylique	1,00%
Alcool stéarylique	1,00%
Diméthicone	1,00%
Gomme xanthane	0,30%
Acide éthylène diamine tétracétique	0,20%
Acide citrique	0,10%
Citrate de sodium	0,10%
Oligonucléotide SEQ ID NO.1	0,10%
Neutralisant, Parfum, Conservateurs	qs.
Eau	qsp. 100%

### 5. Exemple 9 : Lotion visage pour éclaircir le teint

Une lotion dont la composition est présentée dans le Tableau 12 a été préparée.

TABLEAU 12

Alcool éthylique	30,00%
PPG-3 Myristyl éther	5,00%
Glycérine	2,00%
Carbomer	0,20%
Polysorbate 20	0,20%
Oligonucléotide SEQ ID NO.1	0,01%
Neutralisant, Parfum, Conservateurs	qs.
Eau	qsp.
	100%

Cette lotion pour éclaircir le teint s'utilise après le démaquillage et le nettoyage de la peau.

5    **Exemple 10 : Sérum Visage éclaircissant**

Un sérum dont la composition est présentée dans le Tableau 13 a été préparé.

TABLEAU 13

Eau	qsp 100%
Glycerine	2%
EDTA tetrasodique	
Acide citrique	qsp pH souhaité
Citrate trisodique	
Gomme xanthane	0.25%
Polyacrylamide, C13.14 isoparaffin, laureth-7	0.5%
Dimethicone copolyol	0.25%
Oligonucléotide SEQ ID n° 1	0.1%
Parfum, colorant, conservateur	qs

Une goutte de cette composition très concentrée de sérum, s'applique sur le visage généralement avant l'application d'une crème pour le visage. Ce sérum

s'utilise habituellement par cures d'une à deux semaines pour obtenir ou entretenir un éclaircissement du teint.

**Exemple 11 : Lotion capillaire pour éclaircir la chevelure**

- 5 Une lotion capillaire dont la composition est présentée dans le Tableau 14 a été préparée.

TABLEAU 14

Eau	qsp 100%
Alcool	50%
Panthenylethyl ether	0.5%
Acétate DL- $\alpha$ -tocophérol	0.2%
Polysorbate 60	1%
Oligonucléotide SEQ ID NO.1	0.01%
Parfum	0.2%
Glycerine	0.5%
Colorant	qs

Cette lotion s'applique sur les cheveux matin et soir pendant la durée  
10 nécessaire pour obtenir un éclaircissement progressif de la chevelure. Cette durée est généralement de plusieurs semaines.

**Exemple 12 : Gel crème anti-taches pour les mains**

- 15 Un gel-crème dont la composition est présentée dans le Tableau 15 a été préparé.

Ce gel-crème doit être appliqué directement sur les taches de sénescence (lentigos séniles) des mains, pour en atténuer la coloration.

TABLEAU 15

Caprilic/capric diglyceryl succinate	6%
Octyl octanoate	2.5%
Methoxycinnamate d'octyle	6%
Oligonucléotide SEQ ID NO. 1 (phosphodiester)	0.001%
Phenyltriméticone	2.5%
Benzophenon-3	0.5%
Hyaluronate de sodium	0.05%
Gomme xanthane	0.2%
Acrylates/C10.30 alkyl acrylate copolymer	0.5%
Glycerine	2%
PEG 150	3%
Neutralisants, Colorants, parfum, conservateurs	qs
Eau purifiée	qsp 100%

Exemple 13 : Solution dermatologique pour traiter l'hyperpigmentation d'origine pathologique.

5

Un sérum dont la composition est présentée dans le tableau 16 a été préparé.

10

15

TABLEAU 16

Pentacyclométhicone volatile	49,00%
Dioxyde de titane	15,00%
Méthoxycinnamate d'octyle	7,50%
Glycérine	5,00%
Phényltriméthicone	5,00%
Diméthicone copolyol	3,00%
Polyméthylméthacrylate	2,50%
Butyl méthoxydibenzoyle méthane	1,00%
Oligonucléotide SEQ ID NO.1	2,00%
Neutralisant, Parfum, Conservateurs, antioxydants	qs.
Eau	qsp. 100%

Ce sérum s'applique sur la peau quotidiennement pour traiter les personnes  
5 atteintes d'hyperpigmentations régionales.

**REVENDICATIONS**

1. Oligonucléotide comportant un nombre de nucléotides compris entre 7 et 25, de préférence égal à 20, capable de s'hybrider de façon spécifique avec les gènes ou les produits des gènes codant pour la protéine kinase C beta-1 (PKC beta-1).  
5
2. Oligonucléotide selon la revendication 1, capable de s'hybrider de façon spécifique avec une quelconque des régions 5' à 3', codante ou non codante des gènes codant pour la PKC bêta-1
- 10 3. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 ou 2, dont la séquence est l'une des séquences SEQ ID N°1 à SEQ ID N°5 ayant la signification suivante :
  - SEQ ID N°1 : ACACCCCAGGCTAACGATG
  - SEQ ID N°2 : TGG AGT TTG CAT TCA CCT AC
  - SEQ ID N°3 : AAA GGC CTC TAA GAC AAG CT
  - SEQ ID N°4 : GCC AGC ATC TGC ACC GTG AA
  - SEQ ID N°5 : CCG AAG CTT ACT CAC AAT TT
- 15 4. Oligonucléotide selon la revendication 3 dont la séquence est l'une des séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°4.
- 20 5. Oligonucléotide selon la revendication 3 dont la séquence est SEQ ID N°1.
6. Oligonucléotide selon l'une des revendications précédentes, comprenant une ou plusieurs modifications chimiques au niveau de ses parties sucre, ses parties nucléobases ou son squelette internucléotidique, lesdites modifications conférant des caractéristiques physico-chimiques améliorées audit oligonucléotide.  
25
7. Oligonucléotide selon la revendication 6, caractérisé en ce que sa partie sucre comprend un substituant 2'-O-fluoro ou 2'-O-alkyle, préférentiellement un substituant 2'-O-éthyloxyméthyle ou 2'-O-méthyle.
8. Oligonucléotide selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce qu'une partie des groupements phosphodiesters de son squelette internucléotidique est remplacée par des groupements phosphorothioates.  
30

9. Oligonucléotide selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce qu'une partie des groupements phosphodiesters de son squelette internucléotidique est remplacée par des groupements méthylphosphonates.
10. Oligonucléotide selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que tous les 5 groupements phosphodiesters sont remplacés par des groupements phosphorothioates.
11. Oligonucléotide selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que tous les groupements phosphodiesters sont remplacés par des groupements méthylphosphonates.
- 10 12. Oligonucléotide selon les revendications 6 ou 7, caractérisé en ce que les groupements phosphodiesters sont remplacés en tout ou partie par des groupements phosphorothioates et/ou par des groupements méthylphosphonates.
13. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 12 auquel on a greffé un 15 vecteur d'administration linéaire de type acide nucléique ou peptidique, ou un vecteur d'administration circulaire de type plasmidique.
14. Composition cosmétique contenant au moins un oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 13 et un milieu cosmétiquement acceptable.
15. Composition cosmétique selon la revendication 14 contenant un ou plusieurs 20 agents actifs choisis parmi un oligonucléotide antisens dirigé contre les produits d'expression du gène de la tyrosinase ; un oligonucléotide antisens dirigé contre les produits d'expression du gène de la tyrosinase-related-protein 1 (TRP-1) ; l'acide ellagique et ses dérivés ; le résorcinol et ses dérivés ; la vitamine C et ses dérivés ; le pantothéate sulfonate et ses dérivés ; des molécules interférant directement ou indirectement avec l'alpha-mélanocyte 25 stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) ou son récepteur ou l'hormone adrénocorticotropique (ACTH) ; les polyols tels que la glycérine le glycol ou le propylène glycol ; les vitamines ; les agents kératolytiques et/ou desquamants tels que l'acide salicylique et ses dérivés ; les alpha- 30 hydroxyacides tels que l'acide lactique ou l'acide malique, seuls ou greffés ; l'acide ascorbique et ses dérivés ; les rétinoïdes et les caroténoïdes en préparation liposomique ou non, tels que le rétinaldéhyde ; le rétinol et ses

- dérivés tels que le palmitate, le propionate ou l'acétate, le bêta-carotène; des agents antiglycations et/ou antioxydants pris seuls ou en association tels que le tocophérol et ses dérivés, la thiotaurine, l'hypotaurine, l'aminoguanidine; la thiamine pyrophosphate, la pyridoxamine, la lysine, l'histidine, l'arginine, la phénylalanine, la pyridoxine, l'adénosine triphosphate ; les agents anti-inflammatoires tels que le stéaryl glycyrrhétinate ; les agents apaisants et leurs mélanges, les filtres solaires chimiques ou physiques tels que le méthoxycinnamate d'octyle, le butyl-méthoxydibenzoyl-méthane, l'oxyde de titane et l'oxyde de zinc ; et les acides désoxyribonucléiques et/ou nucléiques.
- 10 16. Composition cosmétique selon la revendication 14 ou 15, caractérisée en ce que le/les oligonucléotides selon l'invention représentent 0,00001 % à 10 %, de préférence 0,0003 % à 3 % du poids total de la composition.
- 15 17. Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 14 à 16 se présentant sous la forme d'une émulsion contenant une huile, un émulsionnant choisi parmi les esters d'acide gras et de polyéthylène glycol, tels que le stéarate de PEG-20, et les esters d'acide gras et de glycérine, tels que le stéarate de glycérine, et un co-émulsionnant.
18. Utilisation d'une composition selon les revendications 14 à 17 pour dépigmenter ou blanchir la peau, les poils et/ou les cheveux humains.
- 20 19. Utilisation d'un oligonucléotide selon les revendications 1 à 13 à titre d'agent actif inhibiteur de la synthèse de la mélanine pour la fabrication d'une composition cosmétique selon les revendications 14 à 17.
- 25 20. Utilisation d'au moins un oligonucléotide selon les revendications 1 à 13 à titre d'agent actif inhibiteur de la synthèse de la mélanine pour la fabrication d'une composition pharmaceutique topique destinée au traitement ou à la prévention des hyperpigmentations régionales par hyper-activité mélanocytaire telles que les mélasmas idiopathiques, des hyperpigmentations localisées par hyper-activité et prolifération mélanocytaire bénigne telles que les taches pigmentaires séniles (lentigo actiniques), des hyperpigmentations accidentelles telles que la photosensibilisation ou la cicatrisation post-lésionnelle, et pour le traitement de certaines leucodermies telles que le vitiligo.

21. Utilisation selon la revendication 20, caractérisée en ce que le/les oligonucléotides selon l'invention représentent 0,00001 % à 10 %, de préférence 0,0003 % à 3 % du poids total de ladite composition pharmaceutique topique.

## LISTE DE SEQUENCES

<110> LOUIS VUITTON MOËT HENNESSY (LVM)

<120> Oligonucléotides anti-PKC

<130> D21706

<160> 5

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide

<400> 1

acacccccagg ctcaacgatg

20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide

<400> 2

tggagtttgc attcacctac

20

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide

<400> 3

aaaggcctct aagacaagct

20

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide

<400> 4

gccagcatgt gcaccgtgaa

20

<210> 5

2/2

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucléotide

&lt;400&gt; 5

ccgaagctta ctcacaattt

20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/003397

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 C12N15/11 C07H21/00 A61K7/48 A61K31/7088 A61P17/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 C12N C07H A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95/02069 A (BENNETT C FRANK ; BOGGS RUSSELL T (US); DEAN NICHOLAS M (US); ISIS PHA) 19 January 1995 (1995-01-19) page 26; table 3 page 25, line 25 – page 26, line 26 page 3, line 6 – page 4, line 7; claims 3-7,12,13 page 25, line 25 – page 26, line 26	1-13
Y	----- -/-	14-21

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 December 2005

Date of mailing of the international search report

16/01/2006

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gohlke, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2004/003397

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PARK H-Y ET AL: "THE BETA ISOFORM OF PROTEIN KINASE C STIMULATES HUMAN MELANOGENESIS BY ACTIVATING TYROSINASE IN PIGMENT CELLS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 268, no. 16, 5 June 1993 (1993-06-05), pages 11742-11749, XP002036373 ISSN: 0021-9258 abstract	1-21
Y	NISHIZUKA Y: "THE MOLECULAR HETEROGENEITY OF PROTEIN KINASE C AND ITS IMPLICATIONS FOR CELLULAR REGULATION" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 334, 25 August 1988 (1988-08-25), pages 661-665, XP001118326 ISSN: 0028-0836 the whole document page 662, right-hand column, line 3 - page 663, left-hand column, line 17; table 1	1-21
Y	WO 01/58918 A (JOLY REGINE ; LVMH RECH (FR); KURFURST ROBIN (FR)) 16 August 2001 (2001-08-16) cited in the application claims	1-21
Y	WO 97/35998 A (GILCHREST BARBARA A ; UNIV BOSTON (US); PARK HEE YOUNG (US)) 2 October 1997 (1997-10-02) abstract	1-21

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/003397

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9502069	A	19-01-1995	AU	7007198 A		30-07-1998
			AU	688354 B2		12-03-1998
			AU	7398194 A		06-02-1995
			BR	9406931 A		10-09-1996
			CA	2166058 A1		19-01-1995
			EP	0714449 A1		05-06-1996
			FI	960089 A		07-03-1996
			HU	75834 A2		28-05-1997
			JP	8507929 T		27-08-1996
			JP	3553068 B2		11-08-2004
			JP	3349500 B2		25-11-2002
			JP	2001224386 A		21-08-2001
			JP	3349501 B2		25-11-2002
			JP	2001231579 A		28-08-2001
			JP	3349502 B2		25-11-2002
			JP	2001224387 A		21-08-2001
			KR	211424 B1		02-08-1999
			NO	960079 A		29-02-1996
			NZ	269653 A		19-12-1997
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
WO 0158918	A	16-08-2001	AU	3565101 A		20-08-2001
			CN	1411508 A		16-04-2003
			EP	1255827 A2		13-11-2002
			FR	2804960 A1		17-08-2001
			JP	2003521929 T		22-07-2003
			US	2004014700 A1		22-01-2004
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
WO 9735998	A	02-10-1997	AU	723585 B2		31-08-2000
			AU	2422697 A		17-10-1997
			BR	9708390 A		04-01-2000
			CA	2250000 A1		02-10-1997
			CN	1217028 A		19-05-1999
			CZ	9803107 A3		17-02-1999
			EP	0939829 A1		08-09-1999
			JP	2000509251 T		25-07-2000
			KR	2000005059 A		25-01-2000
			PL	329109 A1		15-03-1999

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/003397

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
C12N15/11 C07H21/00 A61K7/48 A61K31/7088 A61P17/00

Selon la classification internationale des brevets, (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

C12N C07H A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERÉS COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 95/02069 A (BENNETT C FRANK ; BOGGS RUSSELL T (US); DEAN NICHOLAS M (US); ISIS PHA) 19 janvier 1995 (1995-01-19) page 26; tableau 3 page 25, ligne 25 – page 26, ligne 26 page 3, ligne 6 – page 4, ligne 7; revendications 3-7,12,13 page 25, ligne 25 – page 26, ligne 26 ----- -/-	1-13
Y		14-21

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après celle date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'éial de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 décembre 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16/01/2006

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patenlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gohlke, P

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/003397

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	PARK H-Y ET AL: "THE BETA ISOFORM OF PROTEIN KINASE C STIMULATES HUMAN MELANOGENESIS BY ACTIVATING TYROSINASE IN PIGMENT CELLS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 268, no. 16, 5 juin 1993 (1993-06-05), pages 11742-11749, XP002036373 ISSN: 0021-9258 abrégé	1-21
Y	NISHIZUKA Y: "THE MOLECULAR HETEROGENEITY OF PROTEIN KINASE C AND ITS IMPLICATIONS FOR CELLULAR REGULATION" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 334, 25 août 1988 (1988-08-25), pages 661-665, XP001118326 ISSN: 0028-0836 le document en entier page 662, colonne de droite, ligne 3 – page 663, colonne de gauche, ligne 17; tableau 1	1-21
Y	WO 01/58918 A (JOLY REGINE ; LVMH RECH (FR); KURFURST ROBIN (FR)) 16 août 2001 (2001-08-16) cité dans la demande revendications	1-21
Y	WO 97/35998 A (GILCHREST BARBARA A ; UNIV BOSTON (US); PARK HEE YOUNG (US)) 2 octobre 1997 (1997-10-02) abrégé	1-21

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2004/003397

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9502069	A 19-01-1995	AU 7007198 A AU 688354 B2 AU 7398194 A BR 9406931 A CA 2166058 A1 EP 0714449 A1 FI 960089 A HU 75834 A2 JP 8507929 T JP 3553068 B2 JP 3349500 B2 JP 2001224386 A JP 3349501 B2 JP 2001231579 A JP 3349502 B2 JP 2001224387 A KR 211424 B1 NO 960079 A NZ 269653 A	30-07-1998 12-03-1998 06-02-1995 10-09-1996 19-01-1995 05-06-1996 07-03-1996 28-05-1997 27-08-1996 11-08-2004 25-11-2002 21-08-2001 25-11-2002 28-08-2001 25-11-2002 21-08-2001 02-08-1999 29-02-1996 19-12-1997
WO 0158918	A 16-08-2001	AU 3565101 A CN 1411508 A EP 1255827 A2 FR 2804960 A1 JP 2003521929 T US 2004014700 A1	20-08-2001 16-04-2003 13-11-2002 17-08-2001 22-07-2003 22-01-2004
WO 9735998	A 02-10-1997	AU 723585 B2 AU 2422697 A BR 9708390 A CA 2250000 A1 CN 1217028 A CZ 9803107 A3 EP 0939829 A1 JP 2000509251 T KR 2000005059 A PL 329109 A1	31-08-2000 17-10-1997 04-01-2000 02-10-1997 19-05-1999 17-02-1999 08-09-1999 25-07-2000 25-01-2000 15-03-1999

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**